

3/23/00
K0
#7



Jc503 U.S. PTO
09/416579
10/12/99

Bescheinigung

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Deoxynukleosidkinase aus Insektenzellen zur Nukleosidmonophosphatsynthese"

am 12. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in: Roche Diagnostics GmbH.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 12 N 9/12 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Juni 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 46 838.5

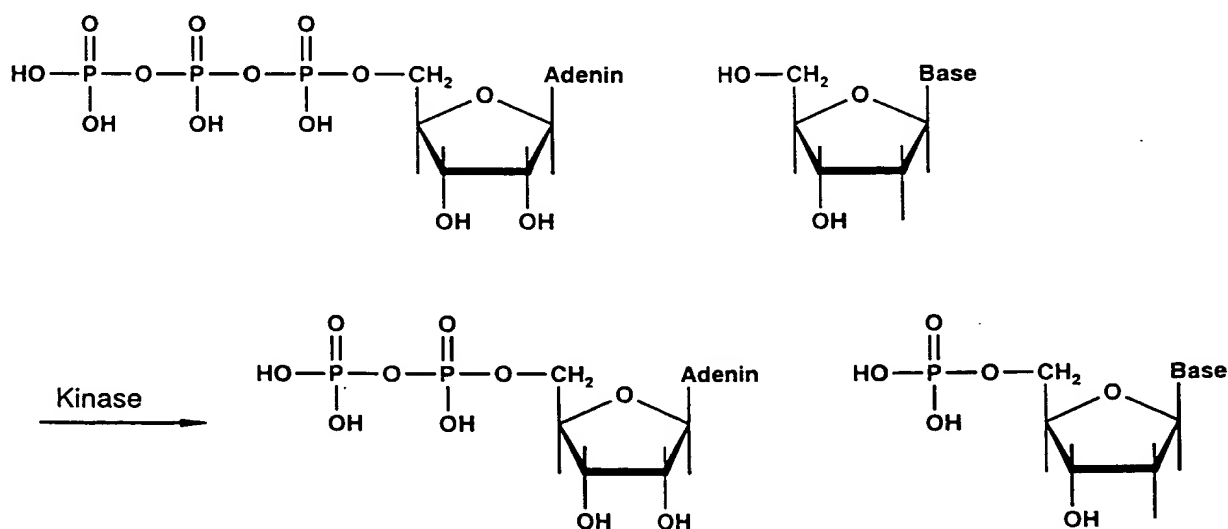
Ebert

Deoxynukleosidkinase aus Insektenzellen zur Nukleosidmonophosphatsynthese

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine rekombinante Kinase aus Insektenzellen wie beispielsweise *Drosophila Melanogaster*, die während der Nukleosidmonophosphatsynthese ohne den Zusatz von stabilisierenden SH-Reagentien, ohne stabilisierende Proteine und ohne Detergentien stabil bleibt und die alle vier natürlichen Deoxynukleoside akzeptiert. Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine DNA Sequenz welche die erfindungsgemäße Kinase codiert, sowie ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kinase und deren Verwendung während der Nukleosidmonophosphatsynthese.

(Deoxy)-Nukleosidkinasen katalysieren die Phosphorylierung von Nukleosiden bzw. Deoxynukleosiden zu den entsprechenden Nukleotidmonophosphaten und tragen damit wesentlich zum "Salvage pathway" des Nukleotidstoffwechsel bei.

Die katalysierte Reaktion ist:



Die Deoxy-Nukleosidmonophosphate sind wiederum Ausgangsprodukte der Deoxy-Nukleosidtriphosphate, welche in sehr stark steigenden Maße als Reagentien für die PCR-Reaktion verwendet werden.

Die Deoxy-Nukleosid-Monophosphate sind zur Zeit auf drei Wegen zugänglich:

1. aus der Hydrolyse von Fischsperma
2. durch chemische Synthese aus den Deoxy-Nukleosiden
3. durch enzymatische Synthese aus den Deoxy-Nukleosiden.

Die bisher bekannten Verfahren weisen eine Reihe von Nachteilen auf. So entstehen bei der Hydrolyse von Fischsperma alle 4 Monophosphate in etwa in gleichen Verhältnissen, eine Tatsache, die am Bedarf des Marktes vorbeigeht (z.B. wird d-UTP, daß teilweise statt d-TTP verwendet wird, aus d-CTP hergestellt). Außerdem ist das bei der Hydrolyse entstehende d-TTP mit ca. 2% d-UTP verunreinigt, und läßt sich praktisch nicht abtrennen.

Weiterhin ist die tierische Herkunft der Edukte unter regulatorischen Gesichtspunkten (GMP) als kritisch zu bewerten. Und nicht zuletzt ist der Markt der Monophosphate aus Fischsperma sehr begrenzt.

Bei der chemischen Synthese entstehen eine ganze Reihe von Nebenprodukten, die bei einer chromatographischen Aufreinigung schwer abzutrennen sind. Außerdem müssen einige Basen (z.B. Guanosin) vor der Phosphorylierung mit Schutzgruppen versehen werden, wodurch der Syntheseaufwand deutlich steigt.

Die Nachteile des Standes der Technik wurden überwunden durch die Bereitstellung einer rekombinanten multifunktionalen Deoxynukleosidkinase aus Insektenzellen wie insbesondere *Drosophila Melanogaster* (Dm-dNK), die während der Nukleosidmonophosphatsynthese ohne den Zusatz von stabilisierenden SH-Reagentien, ohne stabilisierende Proteine und Detergentien stabil bleibt und die alle vier natürlichen Deoxynukleoside akzeptiert: Thymidin (dThd), Deoxy-

cytidin (dCyd), Deoxyadenosin (dAdo) und Deoxyguanosin (dGuo). Stabil im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, daß die Umsatzrate für die katalysierte Reaktion innerhalb von 5 Stunden, bevorzugt innerhalb von 10 Stunden, besonders bevorzugt innerhalb von 12 Stunden bei 37°C praktisch nicht abnimmt. Es ist überraschend, daß das Enzym ohne den Zusatz von thiolhaltigen Stabilisatoren so lange stabil bleibt. Diese Stabilität konnte bei anderen Kinasen bislang nicht beobachtet werden (1-9) Durch das Weglassen dieser Stabilisatoren bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Kinase bei der Synthese läßt sich die Synthese billiger gestalten und vor allem die Aufreinigung der Produkte stark vereinfachen.

Des weiteren haben bisher bekannte Kinasen eine wesentlich höhere Substratspezifität. Dies führt dazu, daß man für die Synthese der einzelnen Nukleoside nicht mehr jeweils eine spezifische Kinase braucht. Besonders vorteilhaft ist die geringe Spezifität für die Synthese von modifizierten Nukleosidanaloga, wie von dideoxy-Nukleosiden, bzw. basen-oder zucker-modifizierten Nukleosiden. Basenmodifizierte Nukleoside sind z.B. 7-deaza-Nukleoside, C-Nucleoside und an der Base mit Reportergruppen (Farbstoffen, Digoxigenin, Biotin) markierte Nucleotide. Zucker-modifizierte Nukleoside sind z.B. Azathymidin, Arabinosyl-Thymidin. Die kinetischen Konstanten der Drosophila-Kinase im Vergleich mit bekannten analogen Enzymen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die spezifische Aktivität k_c der erfindungsgemäßen Kinase ist um ein mehrfaches höher als die der vorbekannten Kinasen. Dadurch wird wesentlich weniger Enzym benötigt, um dNMPs zu synthetisieren. (Faktor 3,5-14.000, Vergleiche K_c -Werte in Tabelle 1). Die Spezifitätskonstante (k_c/K_M) der erfindungsgemäßen Kinase ist um mehrere Potenzen höher als die der vorbekannten Kinasen, sie liegt in der Größenordnung der Diffusionskonstante. Dies führt zu einem vollständigen Umsatz bei Einsatz der Kinase zur d-NMP-Synthese. Sie liegen um den Faktor 2-6500 höher als bisher bekannte Kinasen, siehe Abb. 1.

Überraschenderweise ist das erfindungsgemäße Enzym auch bei 60°C noch stabil, was ebenfalls für die Reaktionsführung von Vorteil ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Kinasen aus anderen Tierarten aus der Klasse der Hexapoda, die vergleichbare Eigenschaften mit denen der Kinase aus Drosophila aufweisen. Insbesondere solche Kinasen, die im wesentlichen die oben beschriebene Stabilität

sowie im wesentlichen die oben beschriebene Substratspezifität aufweisen. Bevorzugt sind Kinasen isoliert aus der Unterklasse der Pterygota, besonders bevorzugt aus der Ordnung der Diptera, besonders bevorzugt aus der Familie der Drosophilidae Gegenstand der Erfindung ist des weiteren eine DNA-Sequenz, die die erfindungsgemäße Kinase codiert. Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz ist dadurch gekennzeichnet, daß die im folgenden aufgeführten Primer an die DNA-Sequenz der erfindungsgemäßen Kinase hybridisieren:

SEQ ID No.: 2

GGGAAGTGGCAGGAGTAGCTCCCG

SEQ ID No.: 3

CTCCCGTTGTAG**CCG**TCGCCCTTCTGG

SEQ ID No.: 4

GACGACTGGCTCGGG**CAG**CTCTTCACCGCG**TTG**

SEQ ID No.: 5

TTCGATTTTTATTACCTCGCGAGGTAA

SEQ ID No.: 6

AGGTAA**AAAT**CGCGTGCGATA**ACGA**AGCAG

SEQ ID No.: 7

CACCGCATGCTTGCGTAGGCCGTCGCCCGTGCAAGACTCCTC

SEQ ID No.: 8

GACTACATGTTTCTAGGGTTCTTCACC

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch solche Kinasen und DNA-Sequenzen, an deren DNA-Sequenz Oligonukleotide mit der SEQ ID No.: 2, 3, 5, 7 und 8 oder mit der SEQ ID No.: 2, 4, 5, 7 und 8 oder mit der SEQ ID No.: 2, 5, 6, 7 und 8 hybridisieren.

Vorteilhaft sind dabei die folgenden Hybridisierungsbedingungen:

- Hybridisierung: 0,75M NaCl, 0,15 Tris, 10mM EDTA, 0,1 % Natriumpyrophosphat, 0,1% SLS, 0,03% BSA, 0,03% Ficoll 400, 0,03% PVP und 100µg/ml boiled calf thymus DNA bei 50°C für ca. 12 Stunden
- Waschen: 3x30 Minuten mit 0,1X SET, 0,1% SDS, 0,1% Natriumpyrophosphat und 0,1M Phosphatpuffer bei 45°C

Die erfindungsgemäße Sequenz der Kinase ist dargestellt in Abb. 5, SEQ ID No.: 1.

Die erfindungsgemäße DNA Sequenz ist erhältlich aus *Drosophila melanogaster* durch das im folgenden beschriebene Verfahren:

Ein pBluescript SK +/- Phagmid, das ein 1.1 kbp cDNA-Insert unter anderem enthaltend das mutmaßliche Gen, das für die Deoxynukleosidkinase kodiert, wurde von dem Berkeley *Drosophila* Genom- Sequenzierungsprojekt bezogen (Klon LD15983). Die ersten 600 Basenpaare vom 5'-Ende der 1.1 kbp cDNA, die über EcoRI und XhoI in die multiple cloning site (MCS) des Phagmids kloniert wurde, waren von Harvey et al. von der Universität Kalifornien, Berkley bereits sequenziert. Basierend auf diesen Sequenzinformationen wurden neue Primer entworfen (DM-TK1 und DM-TK2/ SEQ ID NO. 9 und. SEQ ID NO 10, die eine vollständige Sequenzierung des Inserts ermöglichen. DM-TK1 ist ein 21 bp sense primer, der stromaufwärts des vermuteten Translationsstartregion bindet. DM-TK2 wurde als 21 bp sense Primer nach dem 3'-Bereichs des bereits sequenzierten Teils der cDNA entworfen.

Anhand dieser Sequenz konnte ein offener Leserahmen identifiziert werden, der 750 bp umfasst und für ein Protein mit 250 Aminosäuren codiert. Die DNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO. 1 (Fig. 8.3/ S: 41) dargestellt. Das rechnerische Molekulargewicht dieses Proteins wurde mit 29 kDa ermittelt und stimmt somit mit den Angaben von Munch-Peterson et al. 1998, die die Größe der nativen *DM*-dNK mit annähernd 30 kDa beschrieben hat, überein.

Ausgehend von den Sequenzinformationen konnte das Strukturgen, das für die *DM*-dNK codiert, mittels "polymerase chain reaction" (PCR)-Technik (Mullis, K.B. und Faloona, F.A., Methods in Enzymol. 155 (1987) 335-350) aus dem 1.1 kbp cDNA-Insert des pBluescript SK +/- Phagmids isoliert werden. Dazu wurde ein spezifisches Primerpaar (siehe SEQ ID NO.11 und SEQ ID NO.12) mit entsprechenden Restriktionsendonukleaseschnittstellen für die spätere Insertion in geeignete Expressionsplasmide synthetisiert. So besitzt die 5'-Primer (*DM*-dNK3) eine EcoRI-Restriktionsendonukleaseschnittstelle stromaufwärts der codierenden Sequenz, während die 3'-Primer (*DM*-dNK4) eine HindIII-Restriktionsendonukleaseschnittstelle stromabwärts der codierenden Sequenz beinhaltet. Desweiteren sind im 3'-Primer stromabwärts der codierenden Sequenz zwei Stop-codons zur gesicherten Termination der Translation integriert.

Klonierung des Strukturgens für die *DM*-dNK in pUC18

Der PCR-Ansatz wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und das ca. 750 Bp große Strukturgen wurde aus dem Agarosegel isoliert. Das PCR-Fragment wurde mit den EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen 1 Stunde bei 37°C geschnitten. Gleichzeitig wurde das pUC18-Plasmid mit den EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen 1 Stunde bei 37°C geschnitten, der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das 2635 Bp große Vektorfragment isoliert. Anschließend wurden das PCR-Fragment und das Vektorfragment mittels T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Dazu wurden 1µl (20ng) Vektorfragment und 3µl (100ng) PCR-Fragment, 1µl 10x Ligase-Puffer (Maniatis et al., 1989 B.27), 1µl T4-DNA-Ligase, 4µl steriles H₂O bidestilliert. pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Das klonierte Gen wurde mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung überprüft.

Klonierung des Strukturgens für die *DM*-dNK in geeignete Expressionsvektoren

Zur Expression der *DM*-dNK wurde das Strukturgen in geeignete Expressionsvektoren so kloniert, daß das Strukturgen in der richtigen Orientierung unter Kontrolle eines geeigneten Promotors, bevorzugt einem induzierbaren Promotor, besonders bevorzugt dem lac-, lacUV5-, tac- oder T5-Promotor inseriert ist. Bevorzugte Expressionvektoren sind pUC-Plasmide mit lac- oder lacUV5-Promotor oder pKK-Plasmide.

Dafür wurde das Strukturgen für die *DM*-dNK mittels EcoRI und HindIII aus dem Plasmid pUC18 ausgeschnitten, der Restriktionsansatz durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das ca. 750 Bp große Fragment aus dem Agarosegel isoliert. Gleichzeitig wurden die Expressionsvektoren mit EcoRI und HindIII geschnitten, der Restriktionsansatz durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das resultierende Vektorfragment aus dem Agarosegel isoliert. Die so gewonnenen Fragmente wurden wie beschreiben miteinander ligiert. Die ordnungsgemäße Insertion des Gens wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung nachgeprüft.

Transformation der Expressionsvektoren in verschiedene E.coli Expressionsstämme

Kompetente Zellen verschiedener E.coli-Stämme wurden entsprechend der Methode nach Hanahan (J. Mol. Biol. 166 (1983) pp. 557) hergestellt. 200µl derart hergestellter Zellen wurden mit 20ng isolierten Plasmid-DNA (Expressionsvektoren) versetzt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (90 sec bei 42°C). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium überführt und zur phänotypischen Expression 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Aliquote dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Geeignete Wirtszellen sind E.coli K12 JM83, JM101, JM105, NM522, UT5600, TG1, RR1ΔM15, E.coli HB101, E.coli B.

Expression der *DM*-dNK in E.coli

Zur Expression der *DM*-dNK wurden plasmidhaltige Klone in 3ml Lb_{amp} -Medium angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 550 nm wurden die Zellen mit 1mM IPTG induziert und 4 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550} von 3/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min 6000 rpm, 4°C). Die Zellen wurden in 400µL TE-puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen Proteinfraction getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β-Mercaptoethanol haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurde je 10µl mittels eines 15% analytisches SDS-Gel analysiert (Laemmli U.K. (1970) *Nature* 227: pp. 555-557).

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 9 (DM-dNK1)

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 21 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'-TCCCAATCTCACGTGCAGATC-3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 10: (DM-dNK2)

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 21 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'-TTCATCGAAGAGTCCATTCAC-3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 11: (DM-dNK3)

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 33 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'-GCGCGAATTCATGGCGGAGGCAGCATCCTGTGC-3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 12: (DM-dNK4)

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 33 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'-GCGCAAGCTTATTATCTGGCGACCCTCTGGC-3'

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Nukleosidmonophosphate, durch die nachfolgend beschriebenen Schritte näher gekennzeichnet:

- Synthese der Nukleosidmonophosphate ausgehend von Nukleosiden durch enzymatische Phosphorylierung mit einer erfindungsgemäßen Kinase als Enzym
- Verwendung eines Nukleotidtriphosphats als Phosphatgruppendonator in katalytischen Mengen
- In.situ Regeneration des Phosphatgruppendonors über ein regenerierendes System (CK/CP; PK/PEP; Acetylphosphat/Acylkinase, Pyrophosphat/Pyrophosphorylase)

Als Nukleosidmonophosphat im Sinne der Erfindung gelten die eigentlichen Nucleosidmonophosphate, Deoxynucleosidmonophosphate, Dideoxynucleosidmonophosphate, sowie andere zucker- und basenmodifizierte Nucleosidmonophosphate.

Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Kinase bei der Nukleosidmonophosphatsynthese.

Kurze Beschreibung der Abbildungen:

Abbildung 1:

In Abb. 1 sind die kinetischen Konstanten von verschiedenen Nukleosidkinasen aufgeführt (hTK1/2 = humane Thymidinkinasae 1/2; hdCK= humane deoxy-Cytidinkinase; hdGK = humane deoxy-Guanosinkinase; HSV = Herpes Simplex Virus). Die Daten stammen aus

Munch Petersen et al. J. Biol. Chem. 266, 9032 (1991); J. Biol. Chem. 268, 15621 (1993),
Biochem. Biophys. Acta 1250, 158 (1995),

Bohmann und Eriksson Biochemistry, 27 4258 (1988),

Wang et al. J. Biol. Chemistry 268, 22847 (1993),

Iwatsuki et al. J. Mol. Biol. 29, 155 (1967),

Black et al. J. Gen. Virology 77, 1521 (1996),

Ma et al. P.N.A.S. 93, 14385 (1996).

Abbildung 2:

In Abb. 2 ist die Bildung von d-CMP aus Cytidin unter den im Beispiel 1 genannten Bedingungen gezeigt.

Abbildung 3:

In Abb. 3 ist die Bildung von d-AMP aus Adenosin und d-GMP aus Guanosin unter den in Beispiel 3 genannten Bedingungen gezeigt.

Abbildung 4:

In Abb. 4 ist die Bildung von d-CMP aus Cytidin unter den in Beispiel 3 genannten Bedingungen gezeigt.

Abbildung 5:

Die Abb. 5 zeigt die DNA-Sequenz des Clones.

Abbildung 6:

Die Abb. zeigt das Temperaturoptimum der Nucleosidkinase aus *D. melanogaster*.

Abbildung 7:

Die Abbildung zeigt die Stabilität von rekombinanter im Vergleich zu isolierter Dm-Nucleosidkinase. Abb. 7A ist ohne Zusatz von BSA bestimmt worden, Abb. 7B mit Zusatz von BSA.

Referenzenliste

1. Lee, L.-S. and Y.-C. Cheng (1976) Human deoxythymidine kinase. I. Purification and general properties of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia, *J. Biol. Chem.*, 251, 2600-2604.
2. Cheng, Y.-C. and M. Ostrander (1976) Deoxythymidine kinase induced in HeLa TK cells by herpes simplex virus type I and type II. II. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, 251, 2605-2610.
3. Ellims, P.H., T.E. Gan and L. Cosgrove (1982) Human thymidine kinase: Purification and some properties of the TK1 isoenzyme from placenta, *Mol. Cell. Biochem.*, 45, 113-116.
4. Gan, T.E., J.L. Brumley and M.B. Van Der Weyden (1983) Human thymidine kinase. Purification and properties of the cytosolic enzyme of placenta, *J. Biol. Chem.*, 258, 7000-7004.
5. Sherley, J.L. and T.J. Kelly (1988) Human cytosolic thymidine kinase. Purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, 263, 375-382.
6. Munch-Petersen, B., L. Cloos, G. Tyrsted and S. Eriksson (1991) Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides, *J. Biol. Chem.*, 266, 9032-9038.
7. Bohman, C. and S. Eriksson (1988) Deoxycytidine kinase from human leukemic spleen: Preparation and characterization of the homogenous enzyme, *Biochemistry*, 27, 4258-40265.
8. Kierdaszuk, B. and S. Eriksson (1990) Selective inactivation of the deoxyadenosine phosphorylating activity of pure human deoxycytidine kinase: Stabilization of different forms of the enzyme by substrates and biological detergents, *Biochemistry*, 29, 4109-4144.

9. Kristensen, T. Quantification of thymidine kinase (TK1) mRNA in normal and leukemic cells and investigation of structure-function relationship of recombinant TK1 enzyme. 1996. Department of Life Sciences and Chemistry, Roskilde University, Denmark. Ref Type: Thesis/Dissertation. Available at Roskilde University Library.
10. Hanahan D., (1983) *J. Mol. Biol.* **166**: 557
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual second Edition*, B.27 Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (USA)
12. Mullis, K.B. und Faloona, F.A., (1987) *Methods in Enzymol.* **155**: 335-350
13. Munch-Peterson B., Piskur J. und Sondergaard L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3926-3931
14. Laemmli U.K. (1970) *Nature* **227**: pp. 555-557

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher:

Beispiel 1

Vergleich Synthese von d-CMP mit und ohne Thiolzugabe

d-Cyt	22 mg
Tris-Puffer pH 8,0	2 ml
MgAc	10 mg
ATP	66 mg
d-NK	0,132 U
CK	100 U
DTT	7mg/0mg

Die Umsatzrate wird über die Integration der Peakflächen in der HPLC bestimmt

Die Umsetzung verläuft im Ansatz ohne DTT nur unwesentlich langsamer, vor allem aber sie bricht auch nach 45 Stunden nicht ab (siehe Abbildung 2).

Beispiel 2

Synthese von d-GMP und d-AMP

d-Ado bzw. d-Guo	28 mg
Wasser	2 ml
MgAc	32 mg
ATP	3 mg
CK	100 U
d-NK	0,396 U

Der Umsatz läuft über 32 Stunden ohne Einbruch, die Umsatzrate liegt über 80%, es müssen keine Thiole zugegeben werden. Es kann auf den Tris-Puffer verzichtet werden (siehe Abbildung 3).

Beispiel 3

Synthese von d-CMP

d-Cyt	22 mg
Tris-Puffer pH 8,0	2 ml
MgAc	32 mg
ATP	3 mg
CK	100 U
d-NK	0,132 U

Auch nach 66 h ist das Enzym trotz fehlender Thiol-Stabilisatoren noch aktiv. Die Umsatzrate liegt bei 80% trotz der Anwendung von nur katalytischen ATP Mengen (siehe Abbildung 4).

Beispiel 4

Synthese von NMPs dd-NMPs und basenmodifizierten d-NTPs

Substratlösung

CP	250 mg
ATP	7 mg
Mg-Acetat	160 mg

in 25 ml 50 mM Tris pH 8,0

Je 0,5 ml der Lösung wird zu ca. 2,5 mg des entsprechenden Nucleosids gegeben. Dazu werden je 50 U Creatinkinase und 0.32 U d-NK gegeben

Ansatz	Nucleosid	Zeit	Umsatzrate
a)	Cytidin	15 h	90 %

b)	dd-Adenosin	70 h	40 %
c)	Iso-Guanosin	2 h	80 %

Beispiel 5

Aktivität der Kinase aus *D. melanogaster* bei verschiedenen Temperaturen

Die Aktivität der Dm-Nukleosidkinase wurde bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Sie zeigt ein breites Optimum mit einem Maximum bei 60°C (siehe Abb. 6)

Der Aktivitätstest ist in Literatur 14 beschrieben.

Beispiel 6

Aktivität von rekombinanter Dm-Kinase im Vergleich mit nativer Dm-Kinase

Die Aktivität von rekombinanter Dm-Kinase im Vergleich mit nativer, isolierter Dm-Kinase wurde bestimmt. Nach verschieden langen Inkubationen in 50 mM Tris pH 7,5 + 2,5 mM MgCl₂ bei 37°C wurde die Restaktivität bestimmt.

Während die rekombinante Dm-Kinase auch ohne Zusatz von BSA stabil bleibt, sinkt die Aktivität der nativen innerhalb von 50 min auf < 20% ab. Durch Zusatz von 2,5 mg/ml BSA bleibt die native Kinase ebenfalls stabil (Abb. 7A + 7B).

Die Halbwertszeit beträgt in Tris-Puffer in Anwesenheit von MgCl₂ 50 h, ohne MgCl₂ 31 h und in reinem Wasser 28 h. Die native Dm-Kinase hat unter gleichen Bedingungen eine Halbwertszeit von <12 min.

Patentansprüche

1. Rekombinante Kinase, die während der Nukleosidmonophosphatsynthese ohne den Zusatz von stabilisierenden SH-Reagentien und ohne stabilisierende Proteine stabil ist und die alle vier natürlichen Deoxynukleotide akzeptiert, erhältlich aus Insektenzellen.
2. Rekombinante Kinase gemäß Anspruch 1, die in aufgereinigter Form eine spezifische Aktivität von mindestens 20 U/mg ($1\text{U} = 1\text{ }\mu\text{mol/min}$) für alle 4 natürlichen Deoxynukleotide aufweist.
3. Rekombinante Kinase gemäß Anspruch 1 oder 2, die eine Spezifitätskonstante k_c/K_m von $>10000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für alle natürlichen Deoxynucleoside aufweist.
4. Rekombinante Kinase gemäß einem der Ansprüche 1-3, die ein breites Temperaturoptimum zwischen 40 und 60 °C aufweist.
5. Rekombinante Kinase gemäß einem der Ansprüche 1-4 erhältlich aus *Drosophila Melanogaster*.
6. DNA Sequenz codierend eine Kinase aus *Drosophila Melanogaster* gemäß einem der Ansprüche 1-5.
7. Vektor enthaltend die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6 und einen Promotor.
8. Wirt der mit einem Vektor gemäß Anspruch 7 transformiert wurde.
9. Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten Kinase gemäß einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die folgenden Schritte durchgeführt werden:
 - 1) Isolierung der codierenden Sequenz der DM-dNK,
 - 2) Klonierung des Strukturgens in bevorzugte Expressionsvektoren für *E.coli* mit

induzierbaren Promotoren,

- 3) Transformation der Expressionsvektoren in bevorzugte E.coli-Wirtsstämme und
- 4) Expression des DM-dNK-Gens in E.coli durch entsprechende Induktion.

- 10. Verwendung einer rekombinanten Kinase erhältlich aus *Drosophila Melanogaster* gemäß einem der Ansprüche 1-5 zur Nukleosidmonophosphatsynthese.
- 11. Verfahren zur Herstellung eines Nukleosidmonophosphates, dadurch gekennzeichnet, daß eine rekombinante Kinase gemäß Ansprüchen 1-5 zur Phosphorylierung eines Nukleosides verwendet wird.

Zusammenfassung

Rekombinante Kinase, die während der Nukleosidmonophosphatsynthese ohne den Zusatz von stabilisierenden SH-Reagentien und ohne stabilisierende Proteine stabil ist und die alle vier natürlichen Deoxynukleotide akzeptiert, und aus Insektenzellen wie z.B. *Drosophila Melanogaster* erhältlich ist. Darüber hinaus betrifft die Erfindung entsprechende DNA-Sequenzen, Vektoren, transformierte Zellen, ein Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Kinase sowie die Verwendung zur Herstellung von Nukleodismonophosphaten.

Abbildung 1 Kinetische Konstanten von Deoxynucleosidkinasen

		dThd	dCyd	dAdo	dGuo	ATP
Dm-dNK	k_c (1/s)	15	15	17,8	18,9	15
	K_m (μ M)	0,9	1	109	650	1
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$	$1,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^7$
hTK1 (1)	k_c (1/s)	4,2				4,2
	K_m (μ M)	0,5				140
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$	$8,3 \times 10^6$				3×10^4
hTK2 (1)	k_c (1/s)	0,3	0,4			0,3
	K_m (μ M)	16	16			2
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$	$1,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$			$1,5 \times 10^5$
hdCK (2)	k_c (1/s)		0,073	0,31	0,4	0,073
	K_m (μ M)		1	120	150	10
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$		$7,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$7,3 \times 10^3$
hdGK (3)	k_c (1/s)			$1,35 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$?
	K_m (μ M)			60	7,6	?
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$			$2,3 \times 10^1$	$2,8 \times 10^2$?
E. Coli TK (4)	k_c (1/s)	1,6				1,6
	K_m (μ M)	9				500
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$	$1,8 \times 10^5$				$3,2 \times 10^3$
HSV TK (5)	k_c (1/s)	0,21	wie dThd (?)			0,21
	K_m (μ M)	0,6				32
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$	$3,8 \times 10^5$				$6,6 \times 10^3$
Lactobac. dAK/dCK (6) bzw. dGK	k_c (1/s)		0,91	0,05	0,7	0,91
	K_m (μ M)		4,5	8,4	7,8	1000
	k_c/K_m $M^{-1}s^{-1}$		2×10^5	6×10^3	$8,9 \times 10^4$	$9,1 \times 10^2$

Abbildung 2

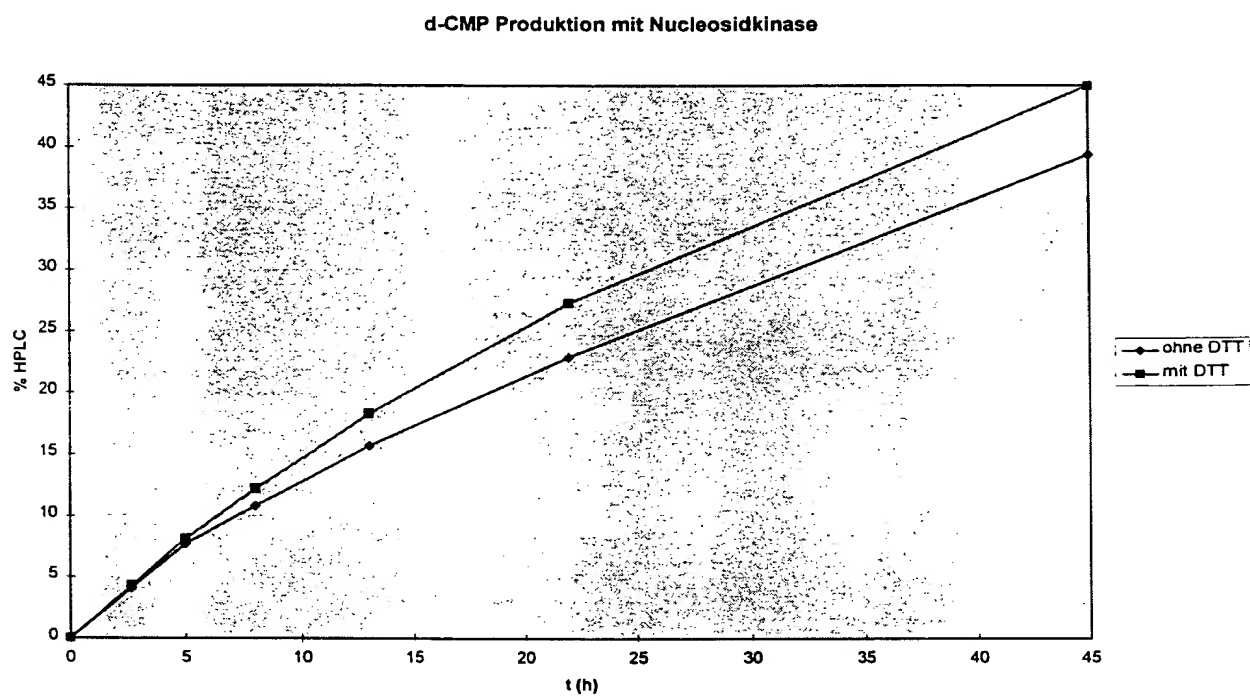


Abbildung 3

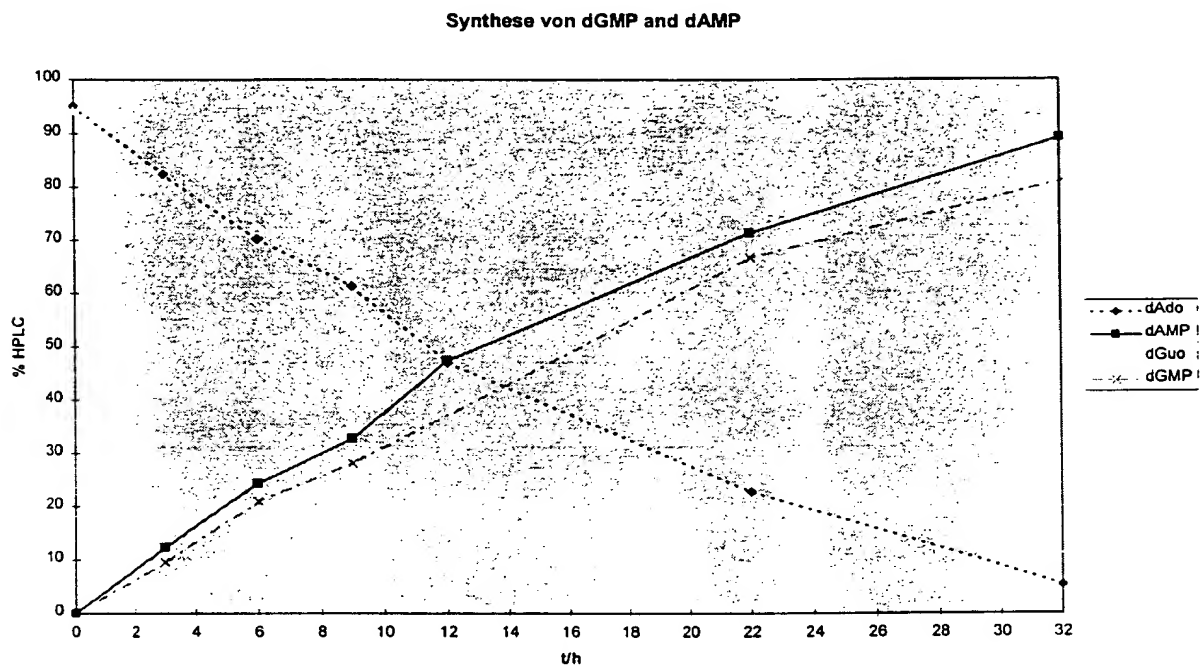


Abbildung 4

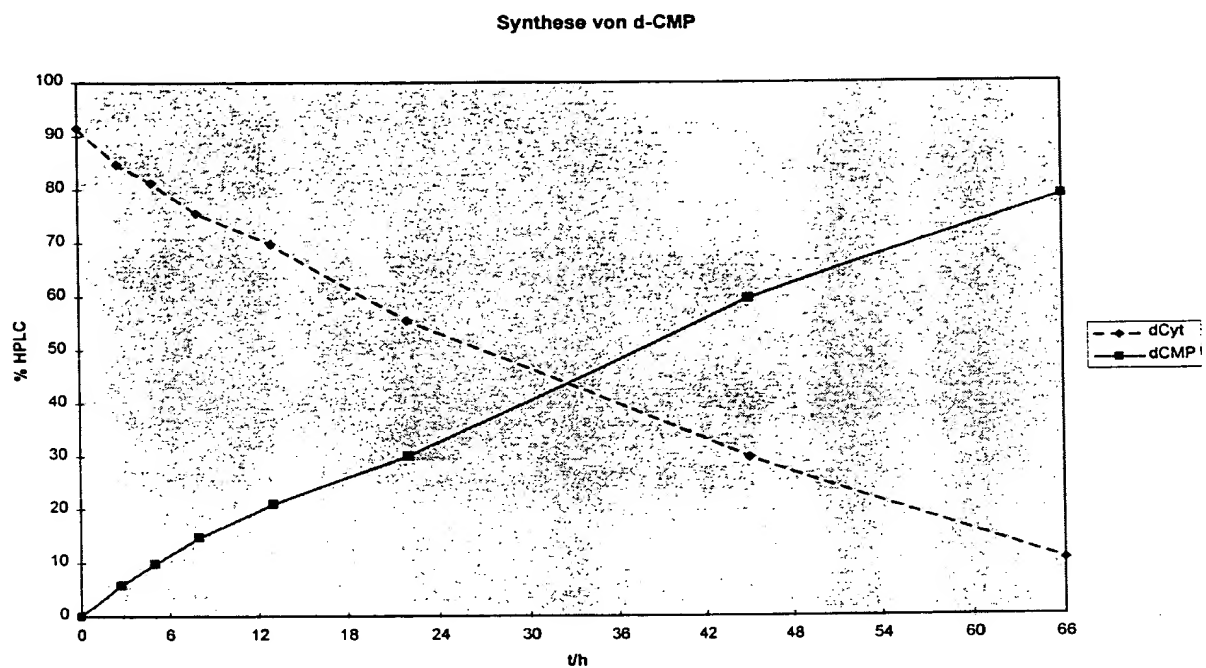


Abbildung 5

Seq. ID 1

GAT CTG GTT CCG CGT
GGA TCC **ATG** GCG GAG GCA GCA TCC TGT GCC CGA AAG GGG ACC AAG TAC GCC
GAG GGC ACC CAG CCC TTC ACC GTC CTC ATC GAG GGC AAC ATC GGC AGC GGG
AAG ACC ACG TAT TTG AAC CAC TTC GAG AAG TAC AAG AAC GAC ATT TGC CTG
CTG ACC GAG CCC GTC GAG AAG TGG CGC AAC GTC AAC GGG GTA AAT CTG CTG
GAG CTG ATG TAC AAA GAT CCC AAG AAG TGG GCC ATG CCC TTT CAG AGT TAT
GTC ACG CTG ACC ATG CTG CAG TCG CAC ACC GCC CCA ACC AAC AAG AAG CTA
AAA ATA ARG GAG CGC TCC ATT TTT AGC GCT CGC TAT TGC TTC GTG GAG AAC
ATG CGA CGA AAC GGC TCG CTG GAG CAG GGC ATG TAC AAT ACG CTG GAG GAG
TGG TAC AAG TTC ATC GAA GAG TCC ATT CAC CTG CAG GCG GAC CTC ATC ATA
TAT CTG CGC ACC TCG CCG GAG GTG GCG TAC GAA CGC ATC CGG CAG CGG GCT
CGT TCT GAG GAG AGC TGC GTG CCG CTT AAG TAC CTT CAG GAG CTG CAT GAG
TTG CAC CAG GAC TGG TTG ATA CAC CAG AGA CGA CCG CAG TCG TGC AAG GTC
CTA GTC CTC GAT GCC GAT CTG AAC CTG GAA AAC ATT GGC ACC GAG TAC CAG
CGC TCG GAG AGC AGC ATA TTC GAC GCC ATC TCA AGT AAC CAA CAG CCC TCG
CCG GTT CGT GTG TCG CCC AGC AAG CGC CAG AGG GTC GCC AGA **TAA** GGA ATT
CAT CGT GAC TGA

Abbildung. 6

Temperaturabhängigkeit der Aktivität von Dm-Kinase

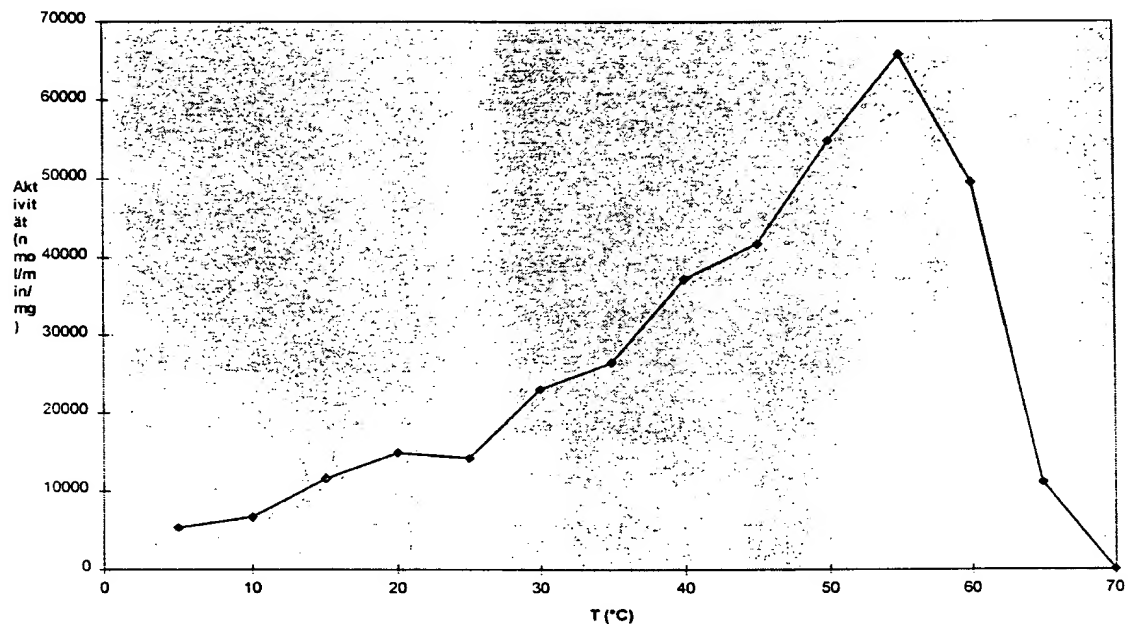


Abbildung 7A

Stabilität von rekombinanter DM-Kinase im Vergleich zu nativer DM-Kinase

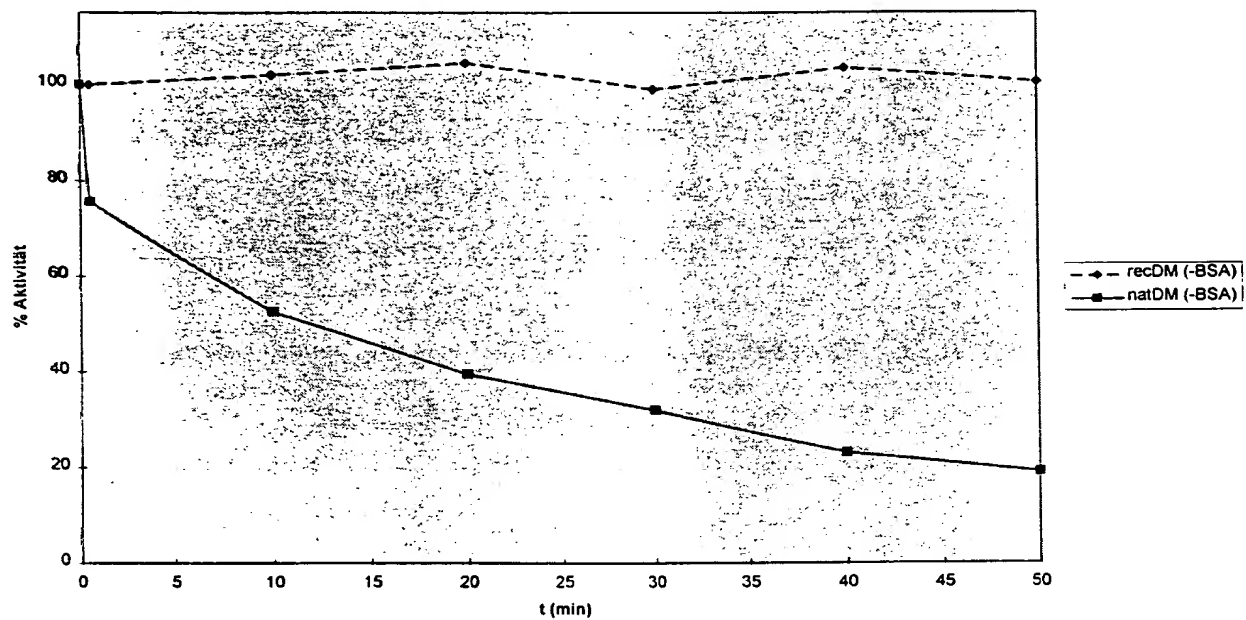


Abbildung 7B

Stabilität von rekombinanter DM-Kinase im Vergleich zu nativer DM-Kinase

